

古典的フェニールケトン尿症の対立遺伝子特異的遺伝子増幅法(ASPCR法)による遺伝子診断法の開発

著者	松本 文子
号	2458
発行年	1992
URL	http://hdl.handle.net/10097/20800

氏 名（本籍）	まつもとあやこ 松 本 文 子
学 位 の 種 類	博 士（医 学）
学 位 記 番 号	医 第 2458 号
学位授与年月日	平 成 4 年 9 月 9 日
学位授与の条件	学位規則第4条第2項該当
最 終 学 歴	昭 和 56 年 3 月 12 日 獨協医科大学医学部医学科卒業
学 位 論 文 題 目	古典的フェニールケトン尿症の対立遺伝子特異的 遺伝子増幅法（ASPCR 法）による遺伝子診断法 の開発

	(主 査)	
論文審査委員	教授 多 田 啓 也	教授 柴 原 茂 樹
	教授 岡 本 宏	

論 文 内 容 要 旨

フェニルケトン尿症（古典的 PKU）は芳香族アミノ酸であるフェニルアラニンをチロシンに転化するフェニルアラニン水酸化酵素（PAH）の先天的欠損により生じる疾患で、治療が行われずに高フェニルアラニン血症が持続する場合には知能障害、情緒障害、痙攣などの中枢神経障害をきたす。遺伝形式は常染色体劣性遺伝であり、その発生率は中国では約1万6千人に1人、欧米では約1万人に1人とアミノ酸代謝異常の中で最も頻度が高い疾患である。

PAH は肝臓のみに局在していることからその酵素診断には肝生検が必須であり、これまでは出生前診断や保因者診断は困難であった。このため古典的 PKU における遺伝子診断法の開発が強く望まれてきた。近年 PAH の遺伝子が明らかにされ、その解析が進められている。PAH の DNA は7種類の制限酵素による消化部位を8か所持っており、RFLP 法によりヨーロッパの白人では46種類以上のハプロタイプに分類される。そして保因者の86%以上はハプロタイプヘテロ接合である為、ハプロタイプを用いた遺伝子診断が約80%以上で可能であり、保因者診断及び出生前診断に役立てられている。しかし東洋人においては正常遺伝子、変異遺伝子ともに80%以上がハプロタイプ4のみで占められる為に、保因者のハプロタイプヘテロ接合の可能性は30~40%である。この為 RFLP 法による遺伝子診断は困難であり、直接的に遺伝子の変異を検出する方法がぜひとも必要である。

今回我々は、患者の乾燥ろ紙血液を用いて東洋人古典的 PKU に見いだされた変異を簡便に検出する方法を開発した。対立遺伝子特異的遺伝子増幅法（ASPCR 法）である。本法の原理は、PCR のプライマー3' 末端の塩基にミスマッチがあると Taq ポリメラーゼによる DNA 増幅が行われないことを利用したものである。それにより正常プライマーでは正常 DNA のみが増幅され、変異プライマーでは変異 DNA のみが増幅される。

今回は、東洋人 PKU に見いだされた変異すなわち Arg¹¹¹ (CGA) → Ter¹¹¹ (TGA) 変異 [R111X 変異], Tyr²⁰⁴ (TAT) → Cys²⁰⁴ (TGT) 変異 [Y204C 変異], Arg⁴¹³ (CGC) → Pro⁴¹³ (CCC) 変異 [R413P 変異] と、スイス地方に頻度が高い変異で東洋人には見られないと思われていた変異の Arg²⁶¹ (CGA) → Gln²⁶¹ (CAA) 変異 [R261Q 変異] を含む4種類の変異についてプライマー作製を行った。これらの特異的プライマーを用いた ASPCR 法の結果は ASO 法の結果と一致しており、そして DNA シーケンスでも変異が確認され、ASPCR 法は信頼性の高い方法であると考えられた。また ASPCR 法による家系調査の結果は理論にかなっていることが確認され、臨床においての保因者診断に十分に活用できるものと考えられた。

遺伝子の点変異の検索法では、ASO 法や direct gel assay 法などが一般に良く用いられてい

るが、これらの方法と比較して ASPCR 法はハイブリダイゼーションや制限酵素による消化などの手間がかからない簡便な方法であり、しかもアイソトープも使わずに行えるという利点を持っている。そして迅速で確実性の高い優れた方法である。そのうえ、ASPCR 法は微量のろ紙血液で検査が可能で、検体の輸送及び収集も手軽にできるという利点もあり、今後の遺伝子診断に大変役立つものと考えられる。

古典的 PKU と診断された中国人60例における ASPCR 法の結果は、変異 DNA のみを持つホモ接合体の例は見られず、正常 DNA と変異 DNA の両方を持つヘテロ接合体は R111X 変異で 8/120 アリール (変異検出率6.7%)、Y204C 変異で12/120 (10.0%)、R413P 変異で 5/120 (4.2%)、また中国人には見られないと思われていた R261Q 変異でも 5/120 (4.2%) 検出された。合計で25.1%の変異検出率であった。現在の時点ではまだ十分な検出率とはいえないが、今後新しい点変異を見つけることによって新たなプライマーを作り、変異検出率を更に増加させることで遺伝子診断の確立が可能になるであろうと期待がもたれる。今回の60例中、複合ヘテロ接合体であると診断がついたのは6例あり、これらの家系については現時点での遺伝子診断が可能である。そして遺伝子診断では血液や羊水細胞を用いて検査が可能で、肝組織による酵素診断の必要がなくなり、保因者診断や出生前診断が容易に行われるようになるであろうと期待される。現在我々は今回示した4種類の変異以外の点変異についても PCR のプライマーを開発中である。

また、点変異ではその種類により PAH 活性の発現にも大きな差が見られることが知られているが、変異の種類を知ることにより治療方針や今後の予後の予測にも遺伝子診断が役に立つであろうと期待がもたれる。

審 査 結 果 の 要 旨

フェニルケトン尿症（PKU）はフェニルアラニン水酸化酵素（PAH）の遺伝的欠損に基づく疾患であり、アミノ酸代謝異常の中で最も頻度の高い疾患である。PAHは肝に局在するためその酵素診断には肝生検が必要であり、これまでは出生前診断や保因者診断は困難であった。近年PAHの遺伝子が明らかにされその解析が進められている。

本研究は、患者の乾燥ろ紙血液を用いて東洋人PKUに見出された変異を対立遺伝子特異的DNA増幅法（ASPCR法）を活用し簡便に検出する方法を開発したものである。本法の原理は、PCRのプライマー3'末端にミスマッチがあるとTaqポリメラーゼによるDNA増幅が行われなないことを利用したものである。それにより正常プライマーでは正常DNAのみが増幅され、変異プライマーでは変異DNAのみが増幅される。

PKUと診断された中国人60例のASPCR法の結果は、変異DNAのみを持つホモ接合体の例は見られず、正常DNAと変異DNAの両方を持つヘテロ接合体はR111X変異で8/120アール（変異検出率6.7%）、Y204C変異で12/120（10.0%）、R413P変異で5/120（4.2%）、R261Q変異で5/120（4.2%）が見出された。合計で25.1%の変異検出率であった。現時点では未だ十分な検出率とはいえないが、今後さらに新しい変異を検索しそれに対応するプライマーを作ることにより変異検出率をさらに増加させることが可能である。今回の60例中、複合ヘテロ接合体であると診断がついたものは6例あり、これらの家系については遺伝子診断が可能である。

遺伝子診断の利点は、肝組織による酵素診断の必要がなくなり、保因者診断や出生前診断が末梢血を用いて可能になる点にある。

以上の研究成果は、フェニルケトン尿症の遺伝子診断の開発に貢献するものであり、医学博士の授与に値すると評価される。